

РАЗВИТИЕ ISOSPORA BIGEMINA В КУЛЬТУРЕ
ТКАНИ ПРИ ЗАРАЖЕНИИ СПОРОЗОИТАМИ

Т. А. Шибалова и В. И. Петренко

Всесоюзный научно-исследовательский институт по болезням птиц,
Ленинград

При введении спорозоитов трех видов кошачьих *Isospora* в различные тканевые культуры удалось проследить некоторые этапы развития одного вида — *I. bigemina*, которые оказались весьма сходными морфологически с вегетативными стадиями *Toxoplasma gondii*. Эти наблюдения могут свидетельствовать о систематической близости между *Toxoplasma* и *Isospora*, что представляет особый интерес в связи с недавней расшифровкой полностью жизненного цикла *T. gondii*.

Возможность культивирования эндогенных стадий жизненного цикла кокцидий (*Eimeria tenella*) была впервые показана Паттоном (Patton, 1965). За прошедшие 6 лет удалось проследить развитие вне организма хозяина ряда видов других кокцидий: *E. brunetti*, *E. necatrix*, *E. acervulina*, *E. meleagritidis*, *E. gallopavonis*, *E. bovis*, *E. auburnensis*, *E. alabamensis*, *E. ninakohlyakimovae*, *E. nieschulzi*, *E. callospermophili*, *E. larimerensis*, *E. bilamellata* (Fayer and Hammond, 1967; Doran and Vetterling, 1967; Шибалова, 1968, 1969, 1970; Bedrnik, 1969; Doran, 1970; Speer and Hammond, 1970).

Полученные данные не только изменили коренным образом наше представление об узкой хозяйинной специфичности у таких облигатных внутриклеточных паразитов, каковыми являются кокцидии, но и углубили наши знания о широте адаптивного спектра этих организмов. Имеющиеся на сегодняшний день данные позволяют сделать вывод, что стадии бесполого цикла приспосабливаются к новым условиям существования при развитии в культуре ткани значительно легче, чем стадии полового цикла. Достаточно сказать, что полный жизненный цикл в культуре ткани удалось проследить только для *E. tenella*.

Проводившиеся до сих пор исследования по культивированию кокцидий ограничены лишь родом *Eimeria*. Между тем аналогичные опыты с другими родами, например с *Isospora*, могли бы представить интерес по крайней мере в нескольких аспектах. Все виды *Eimeria*, осуществлявшие свое развитие в культуре ткани, в норме паразитируют у растительноядных хозяев (домашняя птица, крупный и мелкий рогатый скот). Поэтому сравнение характера развития в культуре ткани кокцидий травоядного хозяина с таковыми кокцидиями, в норме паразитирующими у хищного хозяина, например разные виды *Isospora*, могло бы вскрыть интересные особенности влияния паразито-хозяйинных отношений у этих двух разных групп кокцидий.

Однако еще больший интерес культивирование *Isospora* представляет в связи с возросшим вниманием к этому роду в самые последние годы после того, как был расшифрован полный жизненный цикл *Toxoplasma gondii* (Frenkel et al., 1970; Hutchison et al., 1970, 1971; Dubey, 1970; Overdulve, 1970). Согласно приведенным данным, *Toxoplasma* сближается

с *Isospora*. Полный цикл развития *T. gondii*, прослеженный в кошке, завершается выделением *Isospora* — подобных ооцист. В связи с этим нами была предпринята попытка проследить развитие *Isospora* кошек в некоторых видах культур тканей. Материалом для заражения служили все три вида *Isospora* кошек: *I. bigemina* Stiles (1891), *I. felis* Wenyon (1923), *I. rivolta* Grassi (1879). Ооцисты *Isospora* были получены от экспериментально зараженных котят на Кафедре паразитологии Свердловского сельскохозяйственного института.

Перед проведением экспериментов спорулированные ооцисты каждого вида подвергали обезвреживанию по методике Джексона (Jackson, 1964). Спорозоиты получали по методике Дорана и Фарра (Doran and Farr, 1961) в нашей модификации (Шибалова, 1968, 1969) с небольшими изменениями: спорозисты инкубировались при 37° с добавлением кошачьей желчи. Полученные спорозоиты соответствующих видов отмывались теплым буферным раствором и после суспендирования использовались для инокуляции в пробирки с покровными стеклами с хорошим слоем клеток; инкубация проводилась при 37°. Для заражения были использованы как первичные, так и перевиваемые линии культур тканей; из первичных — фибробласты куриных и перепелиных эмбрионов; из перевиваемых — почки обезьяны (МК-2), эмбриона человека (РН), кролика (РК-13), эмбриона барана (ПЭБ), зеленой мартышки (Vero) и амниотические клетки человека (АК).

В результате удалось наблюдать развитие в перечисленных линиях клеток только *I. bigemina*. Что касается двух других видов — *I. felis*, *I. rivolta*, то нам удалось наблюдать только внедрение их в данные культуры клеток, однако дальнейшего развития не происходило.

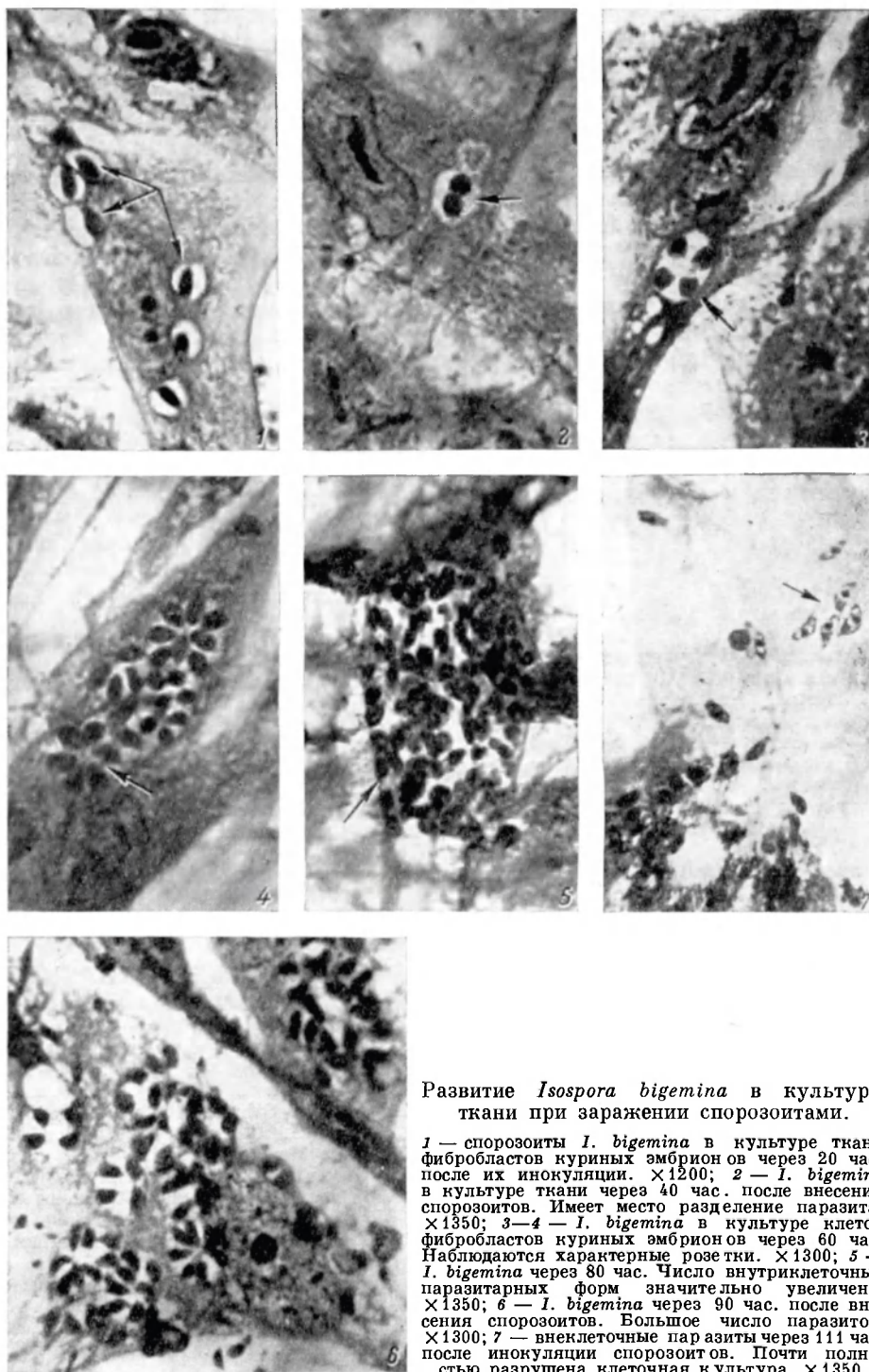
Представленные микрофотографии иллюстрируют развитие *I. bigemina* в культуре ткани фибробластов куриных эмбрионов. Культуры клеток фиксировались метанолом и окрашивались гематоксилином и эозином. На рисунке показаны внедрившиеся в культуру клеток спорозоиты *I. bigemina* через 20 час. после их инокуляции.

Следующие микрофотографии (см. рисунок, 2—7) демонстрируют развитие *I. bigemina* последующих часов, до 111-го часа, с экспозицией между каждым снимком 10—20 час. Нам удалось наблюдать это развитие только в течение 111 час., потому что позже этого времени клетки культур тканей оказались почти полностью разрушенными. Доза спорозоитов *I. bigemina* — 100 000 (взятая нами по аналогии с кокцидиями кур) оказалась значительно завышенной по отношению к культуре ткани как источнику пищи и среде обитания паразита.

Через 96—111 час. свободные паразиты — мерозоиты *I. bigemina* вместе с культуральной средой были введены внутривентрально четырем чистопородным белым мышам, предварительно исследованным на токсоплазмоз по РСК, с негативным результатом. Последующая серологическая проверка мышей на токсоплазмоз дала также отрицательные результаты. Через 7 дней мыши были забиты и вскрыты, а их внутренние органы и головной мозг тщательно исследованы на наличие токсоплазм; ни в одном случае токсоплазмы обнаружены не были.

Отличительной особенностью развития *I. bigemina* в культуре клеток от таковой *Eimeria* состояла в более бурной пролиферативной способности *Isospora*. Клетки культуры как бы «выедались» паразитом, в результате чего для обеспечения их роста и развития приходилось часто, почти ежедневно, менять культуральную среду. Другая отличительная черта этого развития состояла в том, что культивируемые паразиты по своему внешнему виду удивительно напоминали трофозоиты *Toxoplasma* и в то же время отличались от стадий бесполой фазы цикла *Isospora bigemina*, наблюдаемых обычно в кишечнике хозяина.

Проведенные исследования очень созвучны с данными, полученными Шеффилдом и Мелтоном (Sheffield and Melton, 1970), которые культивировали вне организма хозяина *Isospora* — *Toxoplasma*, т. е. паразитов, полученных в результате экспериментального скармливания кошкам мышей, заражен-



Развитие *Isospora bigemina* в культуре ткани при заражении спорозоитами.

1 — спорозоиты *I. bigemina* в культуре ткани фибробластов куриных эмбрионов через 20 час. после их инокуляции. $\times 1200$; 2 — *I. bigemina* в культуре ткани через 40 час. после внесения спорозоитов. Имеет место деление паразита. $\times 1350$; 3—4 — *I. bigemina* в культуре клеток фибробластов куриных эмбрионов через 60 час. Наблюдаются характерные розетки. $\times 1300$; 5 — *I. bigemina* через 80 час. Число внутриклеточных паразитарных форм значительно увеличено. $\times 1350$; 6 — *I. bigemina* через 90 час. после внесения спорозоитов. Большое число паразитов. $\times 1300$; 7 — внеклеточные паразиты через 111 час. после инокуляции спорозоитов. Почти полностью разрушена клеточная культура. $\times 1350$.

ных цистами *Toxoplasma gondii*. Полученные таким образом ооцисты *Toxoplasma* искусственно эксцистировались, и спорозоиты вводились в культуру тканей. Как и в наших опытах, попытка Шеффилда и Мелтона получить развитие *I. felis* и *I. rivolta* оказалась безуспешной, удачными оказались лишь опыты по эксцистированию ооцист *Toxoplasma*, морфологически близких к таковым мелкой формы *I. bigemina*.

В наших опытах мы имели дело с мелкой формой *I. bigemina* (12×8 мк), однако полученной путем пассирования ооцист этого вида через свободных от кокцидиоза котят.

Как показали проведенные серологические пробы, РСК была всегда негативной на токсоплазмоз. В то же время морфологическое сходство картин развития паразита в культуре тканей в нашем материале (*I. bigemina*) и материале Шеффилда и Мелтона (*T. gondii*) поразительно. Более того, прослеженное нами развитие *I. bigemina* в культуре ткани удивительно напоминает развитие *Toxoplasma* во внутренних органах зараженных животных. Оба эти факта могут служить свидетельством в пользу систематической близости между этими организмами. Отрицательная биопроба заставляет подойти к конечной интерпретации полученных результатов с известной осторожностью.

Проведенные исследования представляют собой первую попытку культивирования *Isospora* вне организма хозяина, они требуют дальнейшего расширения и углубления.

Литература

- Шибалова Т. А. 1968. Об эксцистировании спорозоитов *E. tenella* in vitro. Паразитол., 2 (4) : 372—374.
- Шибалова Т. А. 1968. Культивирование *Eimeria tenella* на куриных эмбрионах и в культурах тканей. Паразитол., 2 (5) : 483—484.
- Шибалова Т. А. 1969. Культивирование стадий бесполой фазы жизненного цикла *Eimeria tenella* в культурах клеток, Цитология, 11 (6) : 707—713.
- Шибалова Т. А. 1970. Cultivation of the endogenous stages of chicken coccidia in embryos and tissue cultures. J. Parasitol., 56 (4) : 315—316.
- Шибалова Т. А. 1971. Развитие эндогенных стадий *Eimeria tenella* в культуре тканей. Тр. АН АзССР : 273—275.
- Bedrník P. 1969. Cultivation of *Eimeria tenella* in tissue cultures. 1. Further development of second generation merozoites in tissue cultures. Acta Protozool., 7 : 87—98.
- Doran D. J. and Farr M. M. 1961. In vitro excystation of *Eimeria acervulina*. J. Parasitol., 47 (suppl.) : 45.
- Doran D. J. and Vetterling J. M. 1967. Comparative cultivation of poultry coccidia in mammalian kidney cell cultures. J. Protozool., 14 (4) : 657—662.
- Doran D. J. 1970. *Eimeria tenella*: From sporozoites to oocysts in cell culture. Proc. Helm. Soc. Wash., 37 (1) : 84—92.
- Dubey J. P., Miller N. L. and Frenkel J. K. 1970. *Toxoplasma gondii* life cycle in cats. J. Amer. Vet. Med. Association, 157 (11) : 1767—1770.
- Fayer R. and Hammond D. M. 1967. Development of first-generation shizonts of *Eimeria bovis* in cultures bovine cells. J. Protozool., 14 (4) : 764—772.
- Frenkel J. K., Dubey J. P. and Miller N. L. 1970. *Toxoplasma gondii* in cats: fecal stages identified as coccidian oocysts. Science, 167 : 863—896.
- Hutchison W. M., Dunachie J. F., Siim J. Chr. and Work K. 1970. Coccidianlike nature of *Toxoplasma gondii*. Brit. Med. S., 1 : 142—144.
- Hutchison W. M., Dunachie J. F., Work K. and Siim J. Chr. 1971. The life cycle of the coccidian parasite, *Toxoplasma gondii* in the domestic cat. Trans. Roy. Soc. Trop. Med. Hyg., 653 : 380—399.
- Jackson A. R. B. 1964. The isolation of viable coccidian sporozoites. Parasitol., 54 : 87—93.
- Patton W. H. 1965. *Eimeria tenella*: cultivation of the asexual stages in cultured animal cells. Science, 150 (3607) : 767—769.
- Overdulse G. P. 1970. The identity of *Toxoplasma* Nicolle and Manceaux, 1909 with *Isospora* Schneider, 1881. Proc. Kon. Med. Akad. Wetensch. Ser. C., 73 : 129—151.
- Speer C. A. and Hammond D. M. 1970. Development of eight mammalian *Eimeria* species in cell cultures. J. Parasitol., 56 (4) : 326—327.

ISOSPORA BIGEMINA: SPOROZOITE-INDUCED DEVELOPMENT
OF THE LIFE CYCLE IN TISSUE CULTURE

T. A. Shibalova and V. I. Petrenko

S U M M A R Y

Sporozoites excysted from oocysts of *Isospora bigemina*, *I. felis* and *I. rivolta* were inoculated to various tissue cultures to obtain endogenous development. Sporozoites of all the three species were seen to invade the cultured cells, with *I. bigemina* being the only species to undergo a further development. The most striking feature of the development was a keen resemblance between the growing parasite and the stages of vegetative phase of the *Toxoplasma* life cycle (see the figures) followed usually both in culture and in inner organs of infected animals.

Serological tests (RCF) were applied to mice fed on the parasitic material from the culture with negative results within 7 days after the infection.

The present findings suggest a closeness between *Isospora* and *Toxoplasma* which is in agreement with the recent discoveries of the whole life cycle of *T. gondii*.
